

Cyclic anticoagulant peptides.

Publication number: DE3880194T

Publication date: 1993-08-26

Inventor: KRSTENANSKY JOHN L (US); MAO SIMON J T (US)

Applicant: MERRELL DOW PHARMA (US)

Classification:

- **International:** A61K38/00; A61P7/02; C07K1/02; C07K1/04;
C07K1/13; C07K7/06; C07K7/08; C07K14/81;
C07K14/815; A61K38/00; A61K38/00; A61P7/00;
C07K1/00; C07K7/00; C07K14/81; A61K38/00; (IPC1-
7); C07K7/06; A61K37/02; C07K7/08

- **European:** C07K14/815

Application number: DE19883880194T 19880519

Priority number(s): US19870053204 19870521

Also published as:

 EP0291981 (A2)

 JP63307895 (A)

 FI882359 (A)

 EP0291981 (A3)

 EP0291981 (B1)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE3880194T

Abstract of corresponding document: **EP0291981**

This invention relates to cyclic peptide derivatives of the general formula 1: <CHEM> which are useful anticoagulant agents.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑯ EP 0 291 981 B1

⑯ DE 38 80 194 T 2

⑯ Int. Cl. 5:
C07 K 7/06
C 07 K 7/08
A 61 K 37/02

DE 38 80 194 T 2

⑯ Deutsches Aktenzeichen: 38 80 194.9
 ⑯ Europäisches Aktenzeichen: 88 108 047.7
 ⑯ Europäischer Anmeldetag: 19. 5. 88
 ⑯ Erstveröffentlichung durch das EPA: 23. 11. 88
 ⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 14. 4. 93
 ⑯ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 26. 8. 93

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

21.05.87 US 53204

⑯ Patentinhaber:

Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., Cincinnati, Ohio,
US

⑯ Vertreter:

Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Hermann, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Schmidt, J., Dipl.-Ing.; Jaenichen, H., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte; Tremmel, H., Rechtsanw., 8000 München

⑯ Benannte Vertragstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

⑯ Erfinder:

Krstenansky, John L., Cincinnati Ohio 45208, US;
Mao, Simon J.T., Loveland Ohio 45140, US

⑯ Zyklisches antikoagulierendes Peptid.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 38 80 194 T 2

VOSSIUS & PARTNER
PATENTANWALTE
GIESSEITZSTR. 4
8000 MÜNCHEN 80

1 EP-B-291 981
(88 10 8047.7)
MERRELL DOW PHARMACEUTICALS INC.
5 u.Z.: X 503 EP

07. Mai 1993

Cyclische gerinnungshemmende Peptide

10 Die vorliegende Erfindung betrifft neue cyclische Peptide, welche nützliche gerinnungshemmende Stoffe sind.

Gerinnungshemmer sind nützliche therapeutische Stoffe in der pharmakologischen Behandlung von, zum Beispiel, akuter tiefer Venenthrombose, Lungenembolie, akuter arterieller Verschlußkrankheit der Gliedmaßen, Herzinfarkt und disseminiertem intravaskulärem Koagulations-Syndrom. Von der prophylaktischen Verabreichung von Gerinnungshemmern glaubt man, daß es das erneute Auftreten von Gefäßverschlüssen bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen oder arteriosklerotischen Herzleiden verhindert und das es gewisse thromboembolische Komplikationen bei Operationen verhindert. Die Verabreichung von Gerinnungshemmern ist auch angezeigt bei der Behandlung von Koronararterienerkrankung und Gefäßleiden des Gehirns. Arterielle Thrombose, besonders in Arterien, die den Herzmuskel und das Gehirn versorgen, ist eine Haupttodesursache.

25 Hirudin ist ein 65-Reste-Polypeptid, welches aus Speicheldrüsen von Blutegeln isoliert wird. Es ist ein gerinnungshemmender Stoff, welcher ein Thrombin-spezifischer Hemmstoff ist. Obwohl Hirudin ziemlich wirksam ist, scheint der klinische Gebrauch von Hirudin aus Blutgeleextrakten, auf Grund seiner begrenzten Verfügbarkeit, seiner aufwendigen Herstellung und der allergischen Reaktionen, die gewöhnlich der Verabreichung von Proteinen diese Größe folgen, unwahrscheinlich.

30 Die Anmelder haben eine spezifische Region des Hirudins entdeckt, die zumindest zum Teil für seine gerinnungshemmende Aktivität verantwortlich ist. Diese Region ist chemisch synthetisiert worden und bestimmte cyclische Analoga davon scheinen an die Erkennungsstelle des Thrombins zu binden, aber nicht an die enzymatische Spaltstelle, die räumlich davon getrennt ist. Die Bindung des synthetischen Proteins verhindert kompetitiv die Bindung von Fibrinogen an der Erkennungsstelle des Thrombins, eine Voraussetzung für die Produktion von Fibrin und Gerinselbildung. Die Peptide dieser Erfindung besitzen signifikante gerinnungshemmende Aktivität und ihre ungewöhnliche Fähigkeit, nur an die

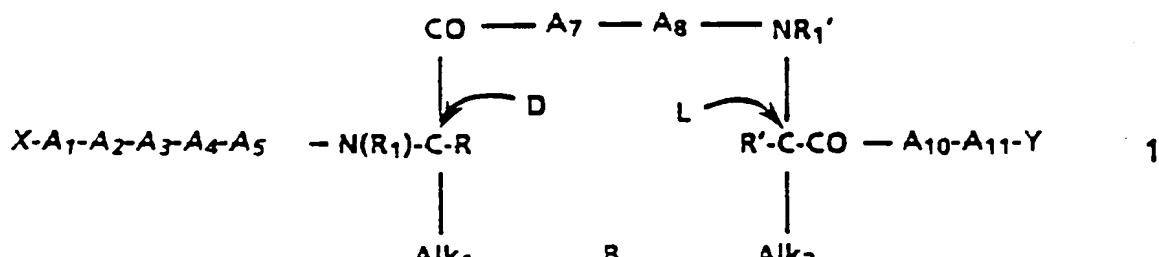
1

Erkennungsstelle und nicht an die Spaltstelle des Thrombins zu binden, könnte einen wissenschaftlich interessanten und therapeutisch signifikanten Zusatz für die gerinnungshemmende Therapie ermöglichen.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Derivate des Hirudins mit der Strukturformel 1:

10



15

in der X einen aminoterminalen Rest, ausgewählt aus Wasserstoff, einem oder zwei Alkylresten mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, einem oder zwei Acylresten mit 2 bis 10 Kohlenstoffatomen, Carbobenzoyloxy- oder tert.-Butyloxycarbonylgruppen bedeutet;

20

A₁ eine Bindung ist, oder ein Peptid mit 1 bis 5 Resten irgendeiner Aminosäure darstellt;

25

A₂ eine der Gruppen Phe, SubPhe (mono- oder disubstituiertes Phenylalanin), β -(2- und 3-Thienyl)-alanin; β -(2- und 3-Furanyl)-alanin, β -(2-, 3- und 4-Pyridyl)-alanin, β -(Benzothien - 2- und 3-yl)-alanin, β -(1- und 2-Naphthyl)-alanin, Tyr oder Trp bedeutet;

30

A₃ Glu oder Asp ist;

A₄ irgendeine Aminosäure ist;

A₅ Ile, Val, Leu, Nle oder Thr bedeutet;

A₇ irgendeine Aminosäure ist;

A₈ irgendeine Aminosäure ist;

35

A₁₀ eine lipophile Aminosäure, ausgewählt aus Tyr, Tyr(SO₃H), Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, His und Pro bedeutet oder ein mindestens eine dieser lipophilen Aminosäuren enthaltendes Dipeptid ist;

A₁₁ eine Bindung ist oder ein Peptidfragment mit 1 bis 5 Resten irgendwelcher Aminosäuren darstellt;

1

Y einen carboxyterinalen Rest, ausgewählt aus OH.(C₁-C₆)-Alkoxy-, Amino-, Mono- oder Di-(C₁-C₄)alkylsubstituierten Amino- oder Benzylaminogruppen bedeutet:

5

R, R', R₁ und R₁' jeweils ausgewählt sind aus Wasserstoffatomen oder (C₁-C₄)-Alkylresten:

B ausgewählt ist aus -S-, oder -S-S- oder -S-Alk₃-S- und Alk₁, Alk₂ und Alk₃ jeweils ausgewählt sind aus (C₁-C₈)-Methylen- oder Ethylengruppen:

10

und wobei "D" und "L" anzeigen, daß die Stereochemie am angegebenen Kohlenstoffatom diejenige ist, die dem D-Cystein bzw. L-Cystein entspricht; die Erfindung betrifft ferner die Dimeren dieser Peptidderivate und ihre Gemische sowie die Verwendung dieser Peptidderivate, Dimeren und Gemische davon als gerinnungshemmende Mittel.

15

Die folgenden geläufigen Abkürzungen von Aminosäuren werden in dieser Patentschrift gebraucht:

Gly - Glycin

20

Ala - Alanin

Val - Valin

Leu - Leucin

Ile - Isoleucin

Pro - Prolin

25

Phe - Phenylalanin

Trp - Tryptophan

Met - Methionin

Ser - Serin

Thr - Threonin

30

Cys - Cystein

Tyr - Tyrosin

Asn - Asparagin

Gln - Glutamin

Asp - Asparaginsäure

35

Glu - Glutaminsäure

Lys - Lysin

Arg - Arginin

His - Histidin

Nle - Norleucin

1	Hyp - Hydroxyprolin
	3,4-DehydroPro - 3,4-Dehydropoline
	Tyr(SO ₃ H) - Tyrosinsulfat
5	Pgl - Phenylglycin
	NMePgl - N-Methylphenylglycin
	Sar - Sarkosin (N-Methylglycin)
	pSubPhe - para-substituiertes Phenylalanin
	SubPhe - substituierte Phenylalanine
10	DAla - D-Alanin
	Ac - Acetyl-Rest
	Suc - Succinyl-Rest
	pClPhe - para-Chlorphenylalanin
	pNO ₂ Phe - para-Nitrophenylalanin
15	Pen - Penicillamin (β,β -Dimethylcystein)
	DCys - D-Cystein

Ein Alkylrest und der Alkylteil eines Alkoxyrestes kann ein geradkettiger, verzweigter oder cyclischer Alkylrest, zum Beispiel eine Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl-, tert.-Butyl-, Pentyl-, Isopentyl-, sek.-Pentyl-, Cyclopentyl-, Hexyl-, Isohexyl-, Cyclohexyl- oder Cyclopentylmethylgruppe sein. Ein Acylrest mit 2 bis 10 Kohlenstoffatomen kann ein geradkettiger, verzweigter, cyclischer, gesättigter oder ungesättigter Acylrest sein, welcher 1 oder 2 Carboneinheiten pro Rest enthält, zum Beispiel eine Acetyl-, Benzoyl- oder Succinylgruppe. Der Ausdruck "eine (C₁-C₈)-Methylen- oder Ethylengruppe" verweist auf eine bivalente Gruppe, welche sich von einem acyclischen oder cyclischen, gesättigten oder ungesättigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen durch bildliches Entfernen von zwei Wasserstoffatomen von einem der Kohlenstoffatome oder von zwei benachbarten Kohlenstoffatomen des Alkylrests herleitet. Beispiele des (C₁-C₈)-Methylen- oder Ethylenrests in dieser Erfindung sind Methylen- oder Methyliden- (-CH₂-), Ethylen- (CH₃CH<), 1-Methylethylen- (CH₃C(CH₃)<), 1-Methylpropyliden- oder sek.-Butyliden- (CH₃CH₂C(CH₃)<), 2,2-Dimethylpropyliden- oder Neopentyliden- (CH₃C(CH₃)₂CH<), Ethylen- oder Dimethylen- (-CH₂-CH₂-), Methylethylen- (-CH₂CH(CH₃)-), Ethylethylen- (-CH₂CH(C₂H₅)-), Ethenylen- oder Vinylen- (-CH=CH-), 1,1-Ethenyliden- (CH₂=C<), 1,1-Cyclohexyliden- (C₆H₁₀<)- und 1,2-Cyclopentyliden (C₅H₈<)gruppen. Eine Halogengruppe bedeutet eine Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodgruppe.

1

Der Ausdruck "irgendeine Aminosäure", wie er hier verwendet wird, beinhaltet die natürlich vorkommenden Aminosäuren wie auch andere "nichtproteinische" α -Aminosäuren, die allgemein auf dem Fachgebiet der Peptidchemie verwendet werden, wenn man synthetische Analoga von natürlich vorkommenden Peptiden herstellt. Die natürlich vorkommenden Aminosäuren sind Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Methionin, Threonin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Cystein, Prolin, Histidin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Ornithin und Lysin. Beispiele für "nichtproteinische" α -Aminosäuren sind Norleucin, Norvalin, Alloisoleucin, Homoarginin, Thiaprolin, Dehydroprolin, Hydroxyprolin (Hyp), Homoserin, Cyclohexylglycin (Chg), α -Amino-n-buttersäure (Aba), Cyclohexylalanin (Cha), Aminophenylbuttersäure (Pba), in der ortho-, meta- oder para-Position des Phenylrests mit (C_1 - C_4)-Alkyl-, (C_1 - C_4)-Alkoxy-, Halogen- oder Nitrogruppen oder mit einer Methylendioxygruppe mono- oder disubstituierte Phenylalanine, β -(2- und 3-Thienyl)alanin, β -(2- und 3-Furanyl)alanin, β -(2-, 3- und 4-Pyridyl)alanin, β -(Benzothienyl-2- und 3-yl)alanin, β -(1- und 2-Naphthyl)alanin, O-alkylierte Derivate von Serin, Threonin oder Tyrosin, S-alkyliertes Cystein, der O-Sulfatester von Tyrosin, 3,5-Diiodtyrosin und die D-Isomere der natürlich vorkommenden Aminosäuren.

10

15

20

25

30

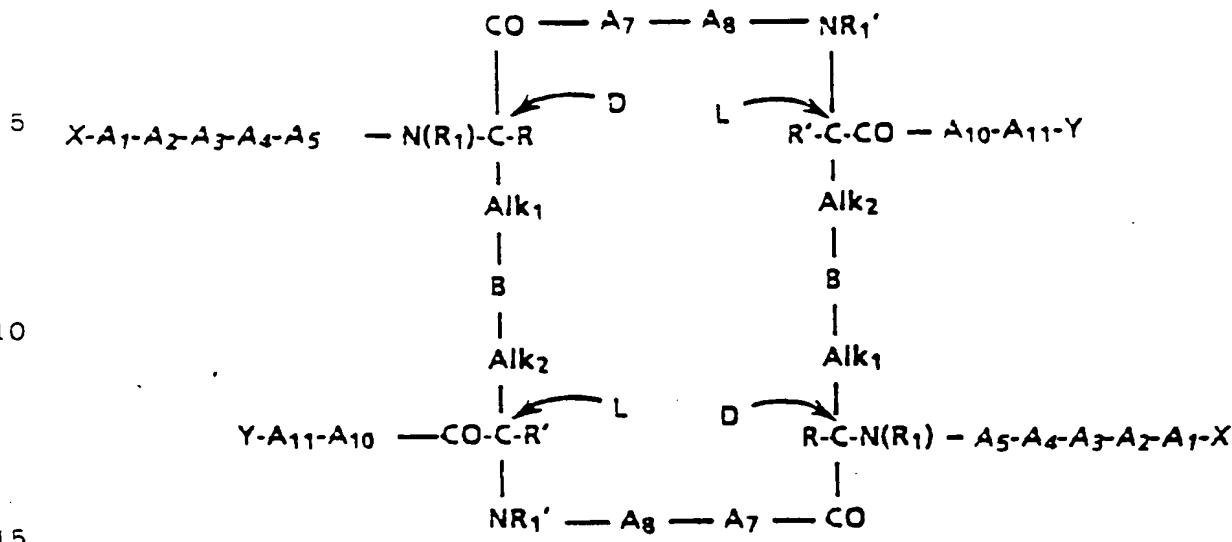
35

Der Ausdruck "lipophile Aminosäure" beinhaltet Tyr, Tyr(SO_3H), Phe, Leu, Nle, Ile, Val, His und Pro.

Die natürlich vorkommenden Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin enthalten ein chirales Kohlenstoffatom. Soweit nicht anderweitig speziell angegeben, handelt es sich bei den hier angegebenen Aminosäuren um die L-Konfiguration. Zum Beispiel kann jede der Aminosäuren der A_1 oder A_{10} Gruppe die D- oder L-Konfiguration besitzen. Wie üblich, ist die Struktur der hier beschriebenen Peptide so, daß das aminotermrale Ende auf der linken Seite der Kette und das carboxyterminale Ende auf der rechten Seite der Kette ist.

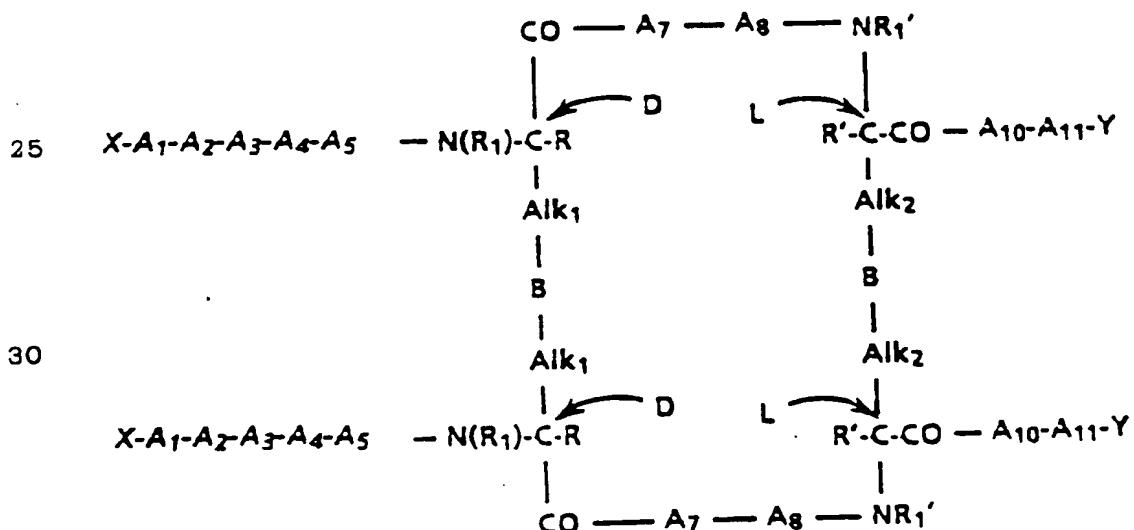
Der Ausdruck "Dimere" bezeichnet jene Peptide, die aus der direkten Verknüpfung von zwei separaten linearen Peptiden während des Cyclisierungsschritts entweder in Kopf zu Kopf oder Kopf zu Schwanz-Weise entstehen. Im Verlauf der Durchführung der gewünschten internen Cyclisierung über die "B"-Gruppe, verbinden sich einige der linearen Peptide des Ausgangsmaterials mit einem anderen linearen Peptid des Ausgangsmaterials statt mit sich selbst. Das entstehende Produkt ist ein "Dimer" in dem Sinne, daß es aus zwei linearen Ausgangspeptiden aufgebaut ist, aber es ist kein Dimer in dem Sinne, daß die Molekülformel des Dimers genau das Doppelte der Molekülformel des Monomeren ist. Ein Dimer der erfindungsgemäßen Peptidderivate hat folgende Strukturformel:

1



Kopf zu Schwanz-Dimer

20



Kopf zu Kopf-Dimer

1 wobei die Substituenten wie vorstehend für Struktur 1 definiert sind. Die hier
 5 verwendete Bezeichnung "Peptidderivate" schließt die Dimeren und Gemische ein.
 soweit es sich aus dem Zusammenhang nicht anders ergibt. Während die
 10 Gemische von Monomer und Dimer, die aus dem Cyclisierungsschritt resultieren,
 leicht durch dem Fachmann bekannte Maßnahmen getrennt werden können, ist es
 15 möglich die Gemische in den gerinnungshemmenden Mitteln dieser Erfindung
 ohne Trennung zu verwenden.

10 Die Polypeptide der Formel 1 können mit beliebigen nichttoxischen,
 organischen oder anorganischen Säuren pharmazeutisch verträgliche Salze
 bilden. Beispiele für anorganische Säuren, welche geeignete Salze liefern, sind
 15 Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Schwefel- und Phosphorsäure und saure
 Metallsalze, wie Natriummonohydrogenorthophosphat und Kaliumhydrogensulfat.
 Beispiele für organische Säuren, welche geeignete Salzliefern, sind die Mono-, Di-
 20 und Tricarbonsäuren. Beispiele für solche Säuren sind Essig-, Glycol-, Milch-,
 Pyruvin-, Malon-, Bernstein-, Glutar-, Fumar-, Äpfel-, Wein-, Zitronen-, Ascorbin-,
 Malein-, Hydroxymalein-, Benzoe-, Hydroxybenzoe-, Phenylessig-, Zimt-, Salicyl-,
 25 2-Phenoxybenzoësäure und Sulfonsäuren, wie Methansulfonsäure und 2-
 Hydroxyethansulfonsäure. Salze der carboxyterminalen Aminosäureeinheit
 schließen nichttoxische Carbonsäuresalze ein, welche mit beliebigen geeigneten
 30 anorganischen oder organischen Basen gebildet werden. Beispiele für diese Salze
 sind solche von Alkalimetallen, wie Natrium oder Kalium; von Erdalkalimetallen, wie
 Kalzium und Magnesium; von Leichtmetallen der Gruppe IIIA, einschließlich
 Aluminium; und von organischen primären, sekundären und tertiären Aminen, wie
 zum Beispiel Trialkylaminen, einschließlich Triethylamin, Procain, Dibenzylamin, 1-
 Ethenamin, N,N'-Dibenzylethylendiamin, Dihydro-abietylamin, N-(Nieder)-
 35 Alkylpiperidin und von anderen geeigneten Aminen.

Wie bei jeder allgemeinen Klasse von chemischen Verbindungen werden
 bestimmte Vertreter bevorzugt. Die Anmelder bevorzugen solche Peptidderivate
 der Formel 1, worin

30 X ein Wasserstoffatom, eine Acetyl- oder Succinylgruppe ist.

Ebenfalls bevorzugt sind solche Verbindungen der Formel 1, worin

35 A₁ -His-Asn-Asp-Gly-Asp-,
 -Asn-Asp-Gly-Asp-,
 -Asp-Gly-Asp-,
 -Gly-Asp-,
 -Asp- oder eine Bindung ist.

1 A₂ vorzugsweise Phe, β -(2- oder 3-Thienyl)alanin, Tyr, Trp oder pClPhe
 ist;

5 A₃ Glu;

5 A₄ Glu, Asp, Pro oder Ala

A₅ Ile;

A₇ Glu, Asp oder Ala;

A₈ Glu oder Asp;

A₁₀ Leu;

10 A₁₁ Pro, Gln, Asp oder Asp-Glu;

Alk₁ und Alk₂ jeweils eine Methylengruppe;

Y OH oder NH₂ und

B -S-S- ist.

15 Besonders bevorzugt sind solche Peptidderivate der Formel 1, worin entweder X eine Acetylgruppe und A₁ Gly-Asp oder Asp ist oder X eine Succinylgruppe und A₁ eine Bindung ist und worin

A₂ Phe, β -(2-Thienyl)alanin oder Tyr ist;

A₃ Glu;

20 A₄ Glu oder Pro;

A₅ Ile;

A₇ Glu;

A₈ Glu oder Asp;

A₉ Tyr, Ala-Tyr oder Glu-Leu;

25 A₁₀ -Leu-Gln- oder -Asp-Glu-;

A₁₁ Pro, Gln, Asp oder Asp-Glu;

R, R', R'' jeweils ein Wasserstoffatom;

Alk₁ und Alk₂ jeweils eine Methylengruppe;

B -S-S- und

30 Y OH ist.

35 Die Peptide dieser Erfindung können durch eine Reihe von Verfahren, welche dem Fachmann ohne weiteres bekannt sind, hergestellt werden. Solche Verfahren schließen die sequenzielle Festphasen und Block-Synthese, das Klonen von Genen und die Kombination dieser Techniken ein. Die sequenzielle Festphasentechnik kann mit Hilfe der etablierten automatisierten Methoden, wie durch den Gebrauch eines automatischen Peptid- "Synthesizer", durchgeführt werden. In diesem Verfahren wird eine am α -Aminoende geschützte Aminosäure an eine Trägerharz gebunden. Das verwendete Trägerharz kann jedes geeignete

..

1 Harz sein, das herkömmlich auf dem Fachgebiet für die Festphasen-Herstellung
5 von Polypeptiden verwandt wird, vorzugsweise Polystyrol, welches mit 0,5 bis
etwa 3% Divinylbenzol vernetzt ist, und welches entweder chlormethyliert oder
hydroxymethyliert worden ist, um Stellen für die Esterbildung mit der anfänglich
eingebrachten α -amingeschützten Aminosäure zu schaffen.

10 Ein Beispiel für ein Hydroxymethyl-Harz wird von Bodanszky et al., Chem. Ind. (London) 38, 1597-98 (1966) beschrieben. Ein chlormethyliertes Harz ist im
15 Handel erhältlich von Bio Rad Laboratories, Richmond, California, und die
Herstellung eines solchen Harzes wird durch Stewart et al., "Solid phase Peptide
Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), Kapitel 1, Seite 1-6 beschrieben.
20 Die geschützte Aminosäure kann an das Harz durch das Verfahren von Gisi, Helv. Chem. Acta, 56, 1476 (1973) gebunden werden. Viele harzgebundene, geschützte
25 Aminosäuren sind im Handel erhältlich. Beispielsweise kann für die Herstellung
eines erfindungsgemäßen Polypeptids, worin das carboxyterminale Ende eine Thr-
Gruppe ist, ein durch eine tert.-Butyloxycarbonylgruppe (Boc) geschütztes Thr,
30 welches an ein benzyliertes, hydroxymethyliertes Phenylacetamidomethyl-Harz
(PAM) gebunden ist, verwendet werden. Dieses Harz ist im Handel erhältlich.

35 Nach der Bindung einer am α -Aminoende geschützten Aminosäure an ein
Trägerharz, wird die Schutzgruppe durch ein geeignetes Verfahren, wie durch
Verwendung von Trifluoressigsäure in Methylenchlorid, Trifluoressigsäure alleine
oder HCl in Dioxan, entfernt. Das Entfernen der Schutzgruppe wird bei
Temperaturen zwischen 0°C und Raumtemperatur ausgeführt. Andere, übliche
40 Spaltungsreagentien und Bedingungen für die Entfernung von spezifischen
 α -Aminoschutzgruppen können verwendet werden. Nach der Entfernung der α -
Aminoschutzgruppe werden die anderen aminogeschützten Aminosäuren
schrittweise in der gewünschten Reihenfolge angebunden. Alternativ dazu können
45 Mehrfach-Aminosäuregruppen durch das Lösungsmittelverfahren verknüpft
werden, ehe man sie mit der an das Trägerharz gebundenen Aminosäuresequenz
verknüpft.

50 Die α -Aminoschutzgruppe, die bei jeder in die Polypeptidkette eingeführten
Aminosäure verwandt wird, kann jede im Fachgebiet bekannte sein. Unter den in
Frage kommenden Klassen von α -Aminoschutzgruppen sind (1) Schutzgruppen
vom Acyl-Typ, wie: Formyl-, Trifluoracetyl-, Phthalyl-, Toluolsulfonyl- (Tosyl-),
55 Benzolsulfonyl-, Nitrophenylsulfonyl-, Tritylsulfonyl-, o-Nitrophenoxyacetyl- und α -
Chlorbutyrylgruppen; (2) Schutzgruppen vom Typ aromatischer Urethane, wie
Benzylloxycarbonyl- und substituierte Benzylloxycarbonylreste, wie
p-Chlorbenzylloxycarbonyl-, p-Nitrobenzylloxycarbonyl-, p-Brombenzylloxycar-
bonyl-, p-Methoxybenzylloxycarbonyl-, 1-(p-Biphenylyl)-1-methylethoxycarbonyl-,

1 α,α -Di-methyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl- und Benzhydryloxycarbonyl-
 5 gruppen; (3) Schutzgruppen vom Typ aliphatischer Urethane, wie tert.-
 Butyloxycarbonyl- (Boc), Diisopropylmethoxycarbonyl-, Isopropyloxycarbonyl-,
 10 Ethoxycarbonyl- und Allyloxycarbonylgruppen; (4) Schutzgruppen vom Cycloalkyl-
 Urethane-Typ, wie Cyclopentyloxycarbonyl-, Adamantyloxycarbonyl- und
 Cyclohexyloxycarbonylgruppen; (5) Schutzgruppen vom Typ der Thiourethane,
 wie Phenylthiocarbonylgruppen; (6) Schutzgruppen vom Alkylrest-Typ, wie
 Triphenylmethyl- (Trityl-) und Benzylgruppen; und (7) Trialkylsilanreste, wie
 Trimethylsilan. Die bevorzugte α -Aminoschutzgruppe ist die tert.-
 Butyloxycarbonylgruppe.

15 Die Auswahl eines geeigneten Verknüpfungsreagenz ist dem Fachmann
 geläufig. Ein besonders geeignetes Verknüpfungsreagenz, wenn die anzufügende
 Aminosäure Gln, Asn oder Arg ist, ist N,N'-Diisopropylcarbodiimid und
 1-Hydroxybenzotriazol. Die Verwendung dieser Reagentien verhindert die Bildung
 von Nitrilen und Lactamen. Andere Verknüpfungsreagenzien sind (1) Carbodiimide
 (z.B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und N-Ethyl-N'-(γ -dimethylaminopropyl-
 carbodiimid); (2) Cyanamide (z.B. N,N-Dibenzylcyanamid); (3) Ketenimine; (4)
 Isoxazoniumsalze (z.B. N-Ethyl-5-phenylisoxazonium-3'-sulfonat); (5)
 monocyklischen Stickstoff enthaltende, heterocyclische Amide von aromatischem
 Charakter, welche ein bis vier Stickstoffatome im Ring enthalten, wie Imidazolide,
 Pyrazolide und 1,2,4-Triazolide. Beispiele für besonders geeignete heterocyclische
 Amide sind N,N'-Carbonyldiimidazol und N,N-Carbonyl-di-1,2,4-triazol; (6)
 alkoxylierte Acetylene (z.B. Ethoxyacetylen); (7) Reagentien, die mit der Carboxyl-
 Einheit der Aminosäure gemischte Anhydride bilden (z.B. Ethylchlorformiat und
 Isobutylchlorformiat) oder die symmetrischen Anhydride der zu koppelnden
 Aminosäuren (z.B. Boc-Ala-O-Ala-Boc) und (8) Stickstoff enthaltende,
 heterocyclische Verbindungen, die eine Hydroxylgruppe an einem Ring-
 Stickstoffatom tragen (z.B. N-Hydroxypthalimid, N-Hydroxysuccinimid und 1-
 Hydroxybenzotriazol). Andere Aktivierungsreagenzien und ihre Verwendung in der
 Peptid-Verknüpfung werden von Kapoor, J. Pharm. Sci., 59, Seite 1-27 (1970)
 beschrieben. Die Anmelder bevorzugen die Verwendung von symmetrischen
 Anhydriden als Verknüpfungsreagenz für alle Aminosäuren außer Arg, Asn und
 Gln.

35 Jede geschützte Aminosäure oder Aminosäuresequenz wird in den
 Festphasenreaktor in ungefähr 4-fachem Überschuß eingebracht und die
 Kopplung wird in einem Medium aus Dimethylformamid : Methylenchlorid (1:1)
 oder in Dimethylformamid alleine oder vorzugsweise Methylenchlorid alleine
 ausgeführt. In Fällen, in denen unvollständige Kopplung auftritt, wird das

1 Verknüpfungsverfahren wiederholt, bevor man die α -Aminoschutzgruppe entfernt
und vor der Kopplung der nächsten Aminosäure im Festphasenreaktor. Der Erfolg
der Verknüpfungsreaktion bei jedem Schritt der Synthese wird durch die
5 Ninhydrin-Reaktion nach E. Kaiser et al., Analyt. Biochem. 34, 595 (1970)
überwacht.

10 Nachdem die gewünschte Aminosäuresequenz erhalten worden ist, wird das
Peptid vom Harz entfernt. Das kann durch Hydrolyse, wie durch die Behandlung
des harzgebundenen Polypeptids mit einer Lösung von Dimethylsulfid, p-Kresol
und Thiokresol in verdünnter wässriger Fluorwasserstoffsäure geschehen.

15 Wie auf dem Fachgebiet der Festphasen-Peptidsynthese bekannt ist, tragen
viele der Aminosäuren funktionelle Gruppen, die einen Schutz während des
Ketten-Aufbaus benötigen. Die Verwendung und die Auswahl einer geeigneten
Schutzgruppe liegt innerhalb der Fähigkeit des Fachmanns und hängt von der zu
schützenden Aminosäure und der Anwesenheit anderer geschützter
20 Aminosäurereste am Peptid ab. Die Auswahl einer solchen Seitenketten-
Schutzgruppe ist kritisch, weil diese nicht während der Abspaltung der
Schutzgruppe des α -Amino-Restes abgespalten werden darf. Zum Beispiel sind
brauchbare Seitenketten-Schutzgruppen für Lysin Benzyloxycarbonyl- und
substituierte Benzyloxycarbonylreste, wobei die Substituenten aus Halogen- (z.B.,
Chlor, Brom, Fluor) und Nitro- (z.B., 2-Chlorbenzyloxycarbonyl-, p-Nitrobenzyl-
oxycarbonyl-, 3,4-Dichlorbenzyloxycarbonylgruppe), Tosyl-, t-Amyloxycarbonyl-,
25 t-Butyloxycarbonyl- und Diisopropylmethoxycarbonylgruppen ausgewählt werden
können. Die alkoholische Hydroxylgruppe von Threonin und Serin kann mit einer
Acetyl-, Benzoyl-, tert.-Butyl-, Trityl-, Benzyl-, 2,6-Dichlorbenzyl- oder
Benzylgruppe geschützt werden. Die bevorzugte Schutzgruppe ist die
Benzylgruppe.

30 Diese Gruppen können durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren
entfernt werden. Typischerweise wird die Entfernung der Schutzgruppen nach der
kompletten Peptidketten-Synthese durchgeführt, aber die Schutzgruppen können
auch zu jeder anderen geeigneten Zeit abgespalten werden.

35 Im allgemeinen werden die cyclischen Peptide ausgehend von einem
geeigneten linearen Derivat entweder vor oder nach dem Abspalten des linearen
Peptids vom festen Träger hergestellt. Die Verbindungen der Formel 1, worin B
eine -S-S- Gruppe ist, werden aus dem entsprechenden freien Sulphydryl-haltigen,
linearen Peptid durch bekannte oxidative Verknüpfungstechniken, wie durch
Oxidation des linearen Peptids mit Kaliumhexacyanoferrat hergestellt, beschrieben
zum Beispiel von Stewart et al., in "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman &
Co., San Francisco 1969), Kapitel 1, Seite 95. Die Verbindungen von Formel 1

1 worin B eine -S-Alk₃-S- Gruppe und Alk₃ eine (C₁-C₈)Ethylen-Gruppe ist, können aus den freien Sulfhydryl-haltigen linearen Peptiden durch Umsetzung mit einem 1,2-Dibrom-Derivat eines geeigneten acyclischen oder cyclischen, gesättigten oder ungesättigten Alkyl-Rest analog zu der in H. I. Mosberg und J. R. Omnaas, J. Amer. Chem. Soc. 107, 2986-2987 (1985) beschriebenen Methode hergestellt werden. Die Verbindungen der Formel 1 worin B eine -S-Alk₃-S- Gruppe und Alk₃ eine (C₁-C₈)Methylen-Gruppe ist, werden aus den freien Sulfhydryl-haltigen linearen Peptiden durch Umsetzung mit einem geeigneten acyclischen oder cyclischen, gesättigten oder ungesättigten Alkylketon oder - aldehyd analog zu der in J. Amer. Chem. Soc. 76, 1945 (1954) beschriebenen Methode hergestellt. Die Herstellung solcher Verbindungen der Formel 1 worin B eine -S- Gruppe ist, kann in der Weise bewirkt werden, wie sie bei K. Jost, Collect. Czech. Chem. Commun. 36, 218 (1971) und in der US-PS Nr. 4 161 521 dargelegt wird.

15 Die gerinnungshemmende Dosis eines erfundungsgemäßen Peptidderivats beträgt 0,2 mg/kg bis 250 mg/kg Körpergewicht pro Tag je nach Patient, Ausmaß der Thrombose, die behandelt werden soll, und dem ausgewählten Peptid-Derivat. Die geeignete Dosis für einen bestimmten Patienten kann ohne weiteres bestimmt werden. Vorzugsweise werden typischerweise 1 bis 4 Dosen täglich mit jeweils 5 mg bis 100 mg aktiver Verbindung verabreicht.

20 Die gerinnungshemmende Therapie ist indiziert für die Behandlung und die Vorsorge einer Reihe von Gerinnungssituationen, besonders koronarer und cerebrovaskulärer Gefäßerkrankung. Fachleute auf diesem Gebiet kennen ohne weiteres die Umstände, die eine gerinnungshemmende Therapie erfordert. Der hier gebrauchte Ausdruck "Patient" bezieht sich auf Säuger, wie Primaten einschließlich des Menschen, Schafe, Pferde, Rinder, Schweine, Hunde, Katzen, Ratten und Mäuse.

25 Obwohl einige der Peptid-Derivate die Passage durch den Darm nach oraler Verabreichung überleben, bevorzugen die Anmelder die nicht-orale Verabreichung, zum Beispiel subkutan, intravenös, intramuskulär oder intraperitoneal; Verabreichung durch eine Depot-Spritze; Abgabe durch Implantate; oder durch Aufbringen auf Schleimhäute, wie der Nase, des Rachens und der Bronchien, beispielsweise durch einen Aerosol-Behälter, der ein Peptid-Derivat dieser Erfindung in einer Spray- oder in Trockenpuderform enthält.

30 Für eine parenterale Verabreichung können die Verbindungen als injizierbare Dosen einer Lösung oder Suspension der Verbindung in einem physiologisch verträglichen Verdünnungsmittel mit einem pharmazeutischen Träger verordnet werden, welcher eine sterile Flüssigkeit, wie Wasser und Öle mit oder ohne

1

Zugabe eines Netzmittels und anderer pharmazeutisch verträglicher Hilfsstoffe sein kann. Beispiele für Öle, welche in diesen Zubereitungen verwendet werden können, sind fossile, tierische, pflanzliche oder synthetische Öle, beispielsweise Erdnußöl, Soyabohnenöl und Mineralöl. Im allgemeinen sind Wasser, Kochsalzlösung, wässrige Dextrose und verwandte Zuckerlösungen, Ethanol und Glykole, wie Propylenglykol oder Polyethylenglykol, als flüssige Träger, besonders für Injektionslösungen, bevorzugt.

Die Verbindungen können in der Form von Depotinjektionen oder als Implantate verabreicht werden, die so formuliert sein können, daß sie eine verzögerte Abgabe des Wirkstoffs erlauben. Der Wirkstoff kann in Kugelchen oder kleine Zylinder gepreßt werden und subkutan oder intramuskulär als Depotinjektion oder Implantat eingeplantzt werden. Implantate können aus inertnen Materialien, wie biologisch abbaubaren Polymeren oder synthetischen Silikonen, beispielsweise Silastik, Silikongummi, welcher von der Dow-Corning Corporation hergestellt wird, bestehen.

Die Erfindung wird durch die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele veranschaulicht.

20

BEISPIEL 1

Darstellung von

25

H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-DCys-Glu-Glu-Cys-Leu-Gln-OH

30

Das Peptid wurde nach dem Festphasenverfahren unter Verwendung von 0,1 mmol eines 0,66 mmol/g Boc-Gln-PAM Harzes hergestellt. Doppelt symmetrische Anhydrid-Kopplungen wurden mit 2,0 mmol Na-Boc-Aminosäure (Peptides International), außer im Fall von Boc-Gln, welches durch das DCC/HOBТ-Verfahren gekoppelt wurde, ausgeführt. Als Seitenkettenschutz wurde verwendet: Asp (Chx), Cys (pMeBzl), Glu(Bzl). Nach dem Abschluß der Synthese wurde der Na-Boc Schutz mit 50% Trifluoressigsäure in Methylenechlorid entfernt. Das Harz wurde drei Mal mit Methylenechlorid gewaschen, durch drei Spülungen mit 10% Diisopropylethylamin in Methylenechlorid neutralisiert, drei Mal mit Methylenechlorid gewaschen, mit N-Acetylimidazol in Methylenechlorid acetyliert, drei Mal mit Methylenechlorid gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Peptid wurde von

35

1 den Schutzgruppen befreit und vom Harz mit Wasser abgespalten und der pH mit
Ammoniumhydroxyd auf 8..5 eingestellt. Kaliumcyanoferrat (0.,01 N) wurde zur
Lösung gegeben. bis die gelbe Farbe bestehen blieb. Die Lösung wurde 30 min
5 gerührt und dann der pH mit Essigsäure auf 4 bis 5 eingestellt. Das Gemisch
wurde dann mit Bio-Rad® AG3-X4A Ionenaustauscher-Harz für 2 Stunden gerührt.
Das Gemisch wurde filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

Das Peptid wurde durch Entsalzung auf einer 92 * 2,6 cm Sephadex® G-15
Säule in 5% wässriger Essigsäure gereinigt und lyophilisiert. Eine präparative
10 HPLC wurde an einer C¹⁸Vydac® 218TP1010 (250 * 10 mm) Säule mit Acetonitril
in 0,1 % wässriger Trifluoressigsäure bei 5 ml/min durchgeführt. Die Hauptfraktion
wurde gesammelt und lyophilisiert. was das gewünschte Produkt ergab. Die
Homogenität wurde durch HPLC und TLC bestimmt. HPLC Vydac® 218TP54 (250
15 * 4,6 mm) C¹⁸ Säule, 2 ml/min. $t_0 = 1,8$ min: die Eluierungszeit mit einem
linearen Gradienten von 25-50% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure bei 1%/min
beträgt 5,5 min. FAB-MS: (M + H) = 1411,7 \pm 1 m μ (ber. 1410). Die Aminosäuren-
Analyse: (6N HCl-Hydrolyse; 24std bei 106°C) siehe Tabelle 1, 57 Gew.-% Peptid-
Gehalt.

20

25

30

35

1
5
10
15
20
25
30
35

Tabelle 1

Beispiel Nr.	Aminosäuren-Analyse (Hydrolyse mit 6N HCl; 24 Std bei 106°C)										
	His	Asx	Ser	Glx	Pro	Ala	Gly	Ile*	Leu	Tyr	Phe
1	-	1.00(1)	-	5.05(5)	-	-	0.95(1)	0.60(1)	1.00(1)	-	1.02(1)

Teile, welche zu allo-Ile während der Hydrolyse umgewandelt werden, sind nicht bestimmt.

1

EP 88 10 8047.7-2110
 Merrell Dow Pharmaceuticals Inc.

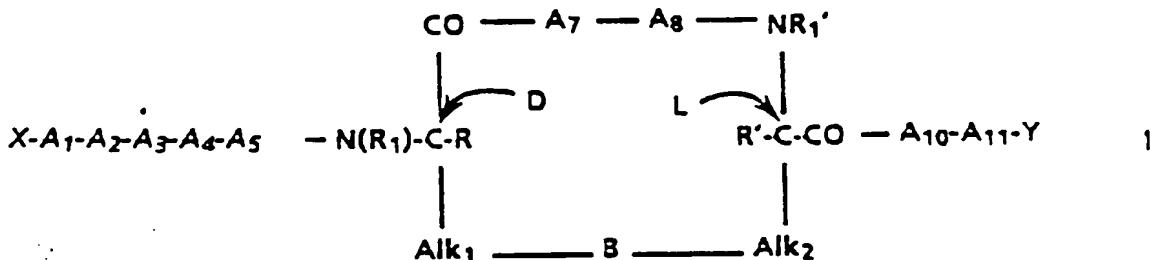
5

Patentansprüche

für die Vertragsstaaten AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

1. Peptidderivat der allgemeinen Formel 1:

10



15

20

in der

X einen Rest an der endständigen Aminogruppe darstellt, ausgewählt aus einem Wasserstoffatom, einem oder zwei Alkylresten mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, einem oder zwei Acylresten mit 2 bis 10 Kohlenstoffatomen, der Carbobenzylxy- oder tert-Butyloxy-carbonylgruppe;

25

A₁ eine Bindung oder ein Peptid mit 1 bis 5 Aminosäureresten ist;

30

A₂ ist Phe, substituiertes Phenylalanin (SubPhe), β -(2- und 3-Thienyl)alanin, β -(2- und 3-Furanyl)alanin, β -(2-, 3- und 4-Pyridyl)alanin, β -(Benzothien-2- und 3-yl)alanin, β -(1- und 2-Naphthyl)alanin, Tyr oder Trp ist;

35

A₃ Glu oder Asp ist;

A₄ irgendeine Aminosäure ist;

A₅ Ile, Val, Leu, Nle oder Thr ist;

A₇ irgendeine Aminosäure ist;

A₈ Glu oder Asp ist;

1 A_{10} eine lipophile Aminosäure, ausgewählt aus Tyr,
 Tyr(SO₃H), Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, His und
 Pro, oder ein Dipeptid, das mindestens eine dieser
 lipophilen Aminosäuren enthält, ist;

5 A_{11} eine Bindung oder ein Peptidfragment mit 1 bis 5 Re-
 sten irgendwelcher Aminosäuren ist;

10 Y einen Rest an der endständigen Carboxygruppe dar-
 stellt, ausgewählt aus -OH, einem (C₁-C₆)Alkoxy-,
 Amino-, Mono- oder Di-(C₁-C₄)alkylsubstituierten
 Amino- oder Benzylaminorest;

15 R, R', R₁ und R₁' jeweils ausgewählt sind aus einem Was-
 serstoffatom oder einem (C₁-C₄)Alkylrest;

20 B ausgewählt ist aus den Gruppen -S-, -S-S- oder
 -S-Alk₃-S-;

25 Alk₁, Alk₂ und Alk₃ jeweils ausgewählt sind aus einer
 (C₁-C₈)Methylen- oder Ethylengruppe;
 und in der "D" und "L" anzeigen, daß die Stereochemie
 des betreffenden Kohlenstoffatoms diejenige ist, die der
 von D-Cystein bzw. L-Cystein entspricht; und die pharma-
 zeutisch verträglichen Salze davon.

2. Peptidderivat gemäß Anspruch 1, in dem A₂ Phe, β -(2-
 oder 3-Thienyl)alanin oder Tyr ist.

3. Peptidderivat gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, in dem A₃
 Glu ist.

4. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, in dem
 A₄ Glu ist.

30 5. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in dem
 A₅ Ile ist.

35 6. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, in dem
 A₇ Glu oder Ala ist.

- 1 7. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, in dem
A₈ Glu oder Asp ist.
- 5 8. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, in dem
A₁₀ Leu ist.
9. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, in dem
A₁₁ Pro, Gln, Asp oder Asp-Gln ist.
- 10 10. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in dem
X ein Wasserstoffatom, eine Acetyl- oder Bernsteinsäure-
gruppe ist.
- 15 11. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, in dem
Y eine der Gruppen OH oder NH₂ ist.
- 20 12. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, in dem
die Reste R, R', R₁, R₁' jeweils ein Wasserstoffatom
sind.
13. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, in dem
B eine Gruppe -S-S- ist.
- 25 14. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, in dem
Alk₁ und Alk₂ jeweils eine Methylengruppe der Formel
-(CH₂)- sind.
- 30 15. Dimer eines Peptidderivats gemäß einem der Ansprüche 1
bis 14 oder ein Gemisch aus dem Dimeren und besagtem
Peptid.
- 35 16. Verfahren zur Herstellung eines Peptidderivats gemäß
einem der Ansprüche 1 bis 14 oder eines Dimeren davon
oder eines Gemisches des Dimeren und des besagten Poly-
peptids, das die Erzeugung des freien Sulfhydryl enthal-
tenden linearen Peptids durch eine Festphasen-Sequenz-
oder Blocksynthese, Genclonierung, oder eine Kombination

1 davon und anschließend die oxidative Kupplung des linearen Peptids umfaßt.

5 17. Festphasen-Sequenz- oder Blocksynthese-Verfahren zur Herstellung eines Peptidderivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder eines Dimeren davon oder eines Gemisches des Dimeren und des besagten Polypeptids, das das Anbinden einer in geeigneter Weise geschützten Amino-

10 säure der Formel A_1 , die die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat, an einen aktivierten Harzträger, nachfolgend das Anbinden der anderen α -Amino-geschützten Aminosäuren der Formeln A_2 bis A_{11} , die die in den vorangegangenen Ansprüchen angegebene Bedeutung haben, an die endständige Aminogruppe der wachsenden Peptidkette, die unterdessen durch Entfernen ihrer Aminoschutzgruppe freigesetzt wurde, und schließlich die oxidative Kupplung des linearen Peptids umfaßt.

20 18. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, ein Dimeres davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen zur Verwendung als Arzneistoff.

25 19. Peptidderivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, ein Dimeres davon oder ein Gemisch dieser Verbindungen zur Verwendung als Antikoagulierungsmittel.

30 20. Arzneimittel, enthaltend eine koagulationshemmend wirkende Menge eines Peptidderivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, eines Dimeren davon oder eines Gemisches dieser Verbindungen und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder ein Verdünnungsmittel.